УДК 579.61

Влияние химической структуры О-антигена разных подвидов *Francisella tularensis* на иммунологические реакции

А. А. Горбатов, Г. М. Титарева, Т. Б. Кравченко, Р. З. Шайхутдинова, В. Н. Герасимов, А. Н. Мокриевич, В. В. Фирстова

Горбатов Алексей Александрович, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, gorbatov1986@mail.ru

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, titarevag@mail.ru

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, kravchenko@obolensk.org

Шайхутдинова Рима Завдатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, shaikhutdinova@yandex.ru

Герасимов Владимир Николаевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела дезинфектологии, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, ilcvngerasimov@obolensk.org

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела особо опасных инфекций, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, mokrievich@obolensk.org

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, firstova@obolensk.org

Наибольшую диагностическую значимость при туляремии играют антитела против липополисахарида (ЛПС). Ранее было показано, что специфические антитела, появляющиеся в сыворотке крови лабораторных животных, зараженных вирулентными штаммами, и людей, переболевших туляремией, могут связываться как с ЛПС *Francisella tularensis*, так и с ЛПС *Francisella novicida*, в то время как при вакцинации специфические антитела к ЛПС *F. novicida* отсутствуют. Целью работы являлось изучение влияния строения О-антигена липополисахарида *F. tularensis* разных подвидов на иммунологические реакции со специфическими антителами. Использовали метод выделения из ЛПС различных штаммов *F. tularensis* по Westphal с модификациями, мягкий кислотный гидролиз и метод негативного контрастирования при электронной микроскопии. Определено соотношение гидрофильной и гидрофобной составляющих молекул ЛПС, выделенных из штаммов различных подвидов. Выявлена корреляция размера капсульного вещества, определенного электронной микроскопией, с соотношением гидрофильной и гидрофобной частей в препаратах ЛПС, полученных из этих же штаммов. Показано, что у вирулентных штаммов *F. tularensis* толщина капсулы и соотношение гидрофильной и гидрофобной частей были выше, чем аналогичные параметры у вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Получены данные, свидетельствующие о наличии капсулы у штамма *F. novicida.* Предложена гипотеза, объясняющая наличие перекрестного реагирования сывороток людей и животных, инфицированных вирулентными штаммами, с ЛПС *F. tularensis* и ЛПС *F. novicida.*

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, липополисахарид, О-антиген, капсула, специфические антитела.

DOI: https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-207-215

Введение

Туляремия – природно-очаговая инфекция, вызываемая бактериями *Francisella tularensis*, по своей эпидемиологической значимости относящаяся к особо опасным из-за высокой инфекционности для человека. Существование довольно большого количества природных очагов этого заболевания на территории РФ требует применения современных серологических методов диагностики при мониторинге заболеваемости среди потенциальных источников туляремии (грызунов), а также при обследовании вакцинированных и заболевших людей.

Фундаментальной проблемой диагностики инфекционных заболеваний является поиск высокоспецифичных и диагностически значимых антигенов. Известно, что основную роль в гуморальном иммунитете при туляремии играют антитела против липополисахарида (ЛПС) [1, 2]. Химическая структура туляремийного ЛПС и его антигенных детерминант, являющихся центрами взаимодействия со специфическими антителами, привлекает внимание исследователей [3, 4]. Одной из особенностей туляремийного ЛПС является биологическая инертность очищенных препаратов вне зависимости от вирулентности штаммов возбудителя.

© Горбатов А. А., Титарева Г. М., Кравченко Т. Б., Шайхутдинова Р. З., Герасимов В. Н., Мокриевич А. Н., Фирстова В. В., 2019

Как и у большинства других грамотрицательных бактерий, ЛПС природных штаммов *F. tularensis* состоит из О-полисахарида (О-антигена), присоединенного к липиду А через олигосахарид кора (S-форма ЛПС) [5, 6]. Как правило, антигенные детерминанты расположены на О-полисахариде, по которым и определяется принадлежность микроорганизма к определенным серотипам. Длина повторяющихся звеньев в полисахаридных цепях О-антигена варьирует в очень широких пределах, что может оказывать влияние на спектр вырабатываемых в процессе инфекции антител.

Ранее было показано [7], что специфические антитела, появляющиеся при инфекционном процессе у лабораторных животных и у переболевших туляремией людей, могут взаимодействовать как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*, в то время как при вакцинном процессе вырабатываются антитела, взаимодействующие только с ЛПС *F. tularensis* при отсутствии антител к ЛПС *F. novicida*.

Целью наших исследований было изучение влияния строения О-антигена липополисахарида *F. tularensis* разных подвидов на иммунологические реакции со специфическими антителами сывороток инфицированных и иммунизированных людей и животных.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали штаммы из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск»: вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в S- и R- формах; вирулентные штаммы различных подвидов: *F. tularensis* 503 и А-1045 subsp. *holarctica*; *F. tularensis* 554, 120 и А-678 subsp. *mediasiatica*; *F. tularensis* Schu и В-399 subsp. *tularensis*; *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112.

Условия культивирования. Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37° С на плотной питательной среде для культивирования туляремийного микроба FTA. Состав FTA: 3,8% эритрит-агар, 1% высушенная кровь крупного рогатого скота, 1% глюкоза, 0,05% цистеин, 0,0025% тиамин хлорид, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Московская обл.).

Получение сывороток крыс. Крыс линии Wistar иммунизировали подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (subsp. *holarctica*) и заражали вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* А-678 (subsp. *mediasiatica*), *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) и *F. tularensis* Utah112 (subsp. *novicida*). На 21-е сутки у животных проводили забор крови для получения сыворотки. Содержание и манипуляции с животными осуществляли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу ВП-2017/6 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Методы выделения ЛПС. Выделение ЛПС проводили методом экстракции по Westphal (1965) с модификациями. Модификация метода заключалась в добавлении стадии переосаждения 3-кратным объемом этилового спирта диализованной водной фазы, содержащей экстрагированные водорастворимые компоненты. Полученные после центрифугирования водно-спиртовой суспензии осадки растворяли в воде и обрабатывали последовательно ферментами: ДНК-азой, РНК-азой и протеиназой К для освобождения от примесей нуклеиновых кислот и белков [8]. Необходимо отметить, что в водную фазу после экстрагирования водно-фенольным раствором переходят все водорастворимые компоненты, к которым, кроме ЛПС, относятся и свободные полисахариды, и нуклеиновые кислоты, и белки. И если содержание двух последних компонентов удается снизить обработкой ферментами ДНК-азой, РНК-азой, протеиназой К с последующим диализом, то свободные полисахариды, возможно, составляющие капсулу, выделяются совместно с ЛПС. Обработанные ферментами растворы после окончания диализа лиофилизировали.

Мягкая кислотная деградация ЛПС. Препараты ЛПС изучаемых штаммов гидролизовали 2% водным раствором уксусной кислоты при температуре 100° С в течение 4 ч для разрыва кислотолабильной кетозидной связи между кором и липидом А. Нерастворимый в воде осадок липида А осаждали центрифугированием (13 000 *g*, 20 мин) и лиофильно высушивали. Водорастворимую фракцию из штаммов *F. tularensis* различных подвидов subsp. *tularensis* (Schu), subsp. *holarctica* (15 НИИЭГ, 503), subsp. *mediasiatica* (678) и subsp. *novicida* (Utah112) также лиофильно высушивали.

Дот- и иммуноблоттинг проводили по стандартным методикам с использованием для детекции связанных с мембранами антител коньюгатов вторичных иммуноглобулинов к IgG человека и крысы с пероксидазой хрена (Sigma, США) в рабочих разведениях согласно инструкции производителя.

Электронная микроскопия. Агаровую культуру *F. tularensis* суспендировали в 1–2 мл 2,5% фиксатора на основе глутарового альдегида (pH 7,5–8,5) и доводили до концентрации, равной 5×10^9 м.к./мл. На сетку с обращенной вверх

пленкой-подложкой наносили 1 каплю обеззараженной взвеси микроорганизмов. Для негативного контрастирования использовали 1-2% раствор натриевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты, 1–2% раствор уранилацетата, раствор ацетата и молибдата аммония. Просмотр клеток проводили на микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (разрешающая способность 70 А°, рабочее напряжение 120 кV). Обработку изображений осуществляли с помощью программы Tecnai Imaging Analysis.

Результаты и их обсуждение

Известно, что макромолекула ЛПС может быть условно разделена на три домена. Липид А – гидрофобная часть молекулы. К нему ковалентно присоединяется коровая часть, которая соединена с полимером из повторяющихся углеводных остатков, называемым О-полисахаридом, или О-антигеном. Липид А является своего рода «якорем», закрепляющим молекулы ЛПС в мембране за счет гидрофобных взаимодействий друг с другом и с фосфолипидным слоем [9–13]. У *F. tularensis*, как и у большинства грамотрицательных бактерий, липид А представляет собой фосфорилированный дисахарид, состоящий из двух остатков D-глюкозамина, ацилированный четырьмя жирнокислотными остатками [14]. Как правило, антигенные детерминанты расположены на О-полисахариде, который и обусловливает иммунологическую индивидуальность серотипов, штаммов, подвидов. Спектр вырабатываемых макроорганизмом антител зависит от структуры и длины О-антигена.

Нами была проведена работа по получению очищенных препаратов ЛПС из бактериальных клеток вакцинных и, что особенно важно, вирулентных штаммов *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis, holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) по Westphal с модификациями [8]. Изучение полученных препаратов методом электрофореза с последующим окрашиванием ионами серебра не выявило картину, характерную для S-форм ЛПС (рис. 1).

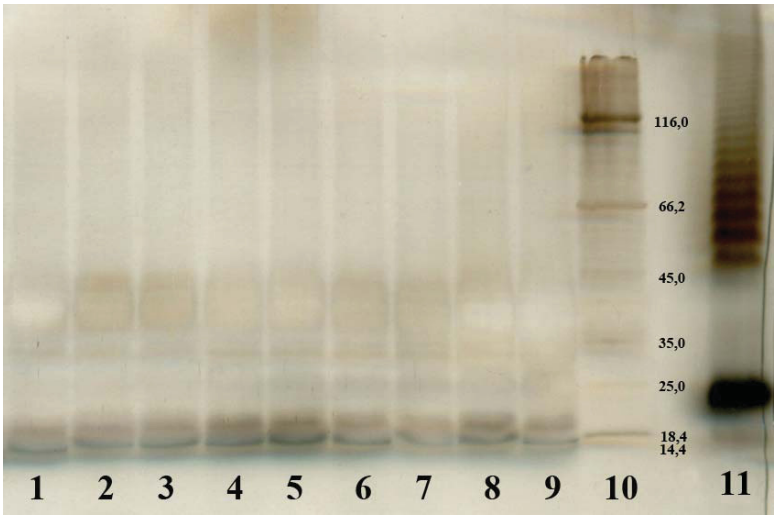

Рис. 1. Электрофоретическое разделение препаратов ЛПС *F. tularensis* различных подвидов, выделенных микрометодом, обработанных протеиназой К; окрашивание ионами серебра: ssp. *holarctica*: 1 – 15 НИИЭГ, 2 – 503, 3 – А-1045; ssp. *tularensis*: 4 – Schu, 5 – В-399; ssp. *mediasiatica*: 6 – 554, 7 – 120, 8 – А-678; ssp. *novicida*: 9 – Utah112; 10 – маркер молекулярных весов (Fermentas #0431); 11 – ЛПС *E. coli*

Fig. 1. Electrophoretic separation of LPS *F. tularensis* preparations of various subspecies, isolated by micromethod, treated with proteinase K; silver ion staining: ssp. *holarctica*: 1 – 15 NIIEG, 2 – 503, 3 – A-1045; ssp. *tularensis*: 4 – Schu, 5 – B-399; ssp. *mediasiatica*: 6 – 554, 7 – 120, 8 – A-678; ssp. *novicida*: 9 – Utah112; 10 – molecular weight marker (Fermentas #0431); 11 – LPS *E. coli*

Действительно, особенностью туляремийного ЛПС является плохая выявляемость на электрофореграммах при окрашивании ионами серебра [15]. Возможно, это связано со структурными особенностями ЛПС *F. tularensis,* в котором в основном присутствуют гексозы, которые на предшествующей стадии окисления слабо окисляются иодной кислотой и, соответственно, слабо связываются с ионами серебра, которые не восстанавливаются при дальнейшей реакции с формальдегидом.

Для определения иммунологически активных центров связывания эпитопов молекулы ЛПС со специфическими антителами методом иммуноблота нам необходимо было получить сыворотки животных, зараженных штаммами различных подвидов *F. tularensis* – *tularensis, holarctica*, *mediasiatica* и *novicida.* Учитывая высокую чувствительность к туляремии лабораторных мышей и морских свинок, мы использовали крыс линии Wistar, поскольку только от этих малочувствительных к туляремии животных можно получить сыворотку после заражения вирулентными штаммами различных подвидов без предварительной иммунизации. Полученные сыворотки использовали для проведения дот- и иммуноблоттинга с препаратами ЛПС различных подвидов *F. tularensis*. Сыворотки, полученные от крыс, зараженных вирулентными штаммами всех подвидов, реагировали с ЛПС, выделенными из штаммов разных подвидов, примерно одинаково, выявляя характерную для S-формы ЛПС «лестницу» при отсутствии неспецифического взаимодействия с ЛПС *E.coli* и достаточно явно взаимодействуя с О-полисахаридной частью ЛПС *F. novicida* (рис. 2).

Интересные результаты были получены при исследовании сывороток, иммунизированных и инфицированных крыс методом дот-блот анализа. Результаы представлены на рис. 3.

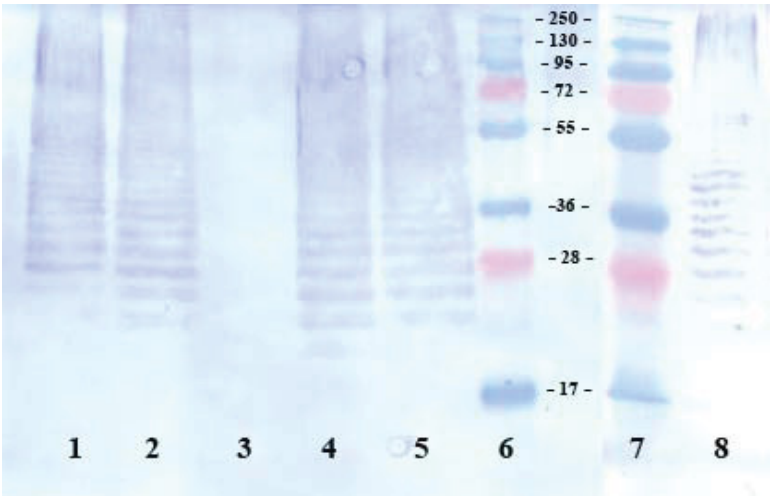

Рис. 2. Иммуноблот препаратов ЛПС, выделенных из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов, с сывороткой крысы линии Wistar, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* A-678 (ssp. *mediasiatica*): 1 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* 503; 3 – *E.coli*; 4 – *F. tularensis* Schu; 5 – *F. tularensis* 678; 6, 7 – маркеры молекулярной массы (Thermo #26619); 8 – *F. novicida* Utah112

Fig. 2. Immunoblot of LPS preparations isolated from bacterial cells of F. *tularensis* of various subspecies, with Wistar rat serum infected with the virulent strain of *F. tularensis* A-678 (ssp. mediasiatica): 1 – *F. tularensis* 15 NIIEG, 2 – *F. tularensis* 503, 3 – *E.coli*; 4 – *F. tularensis* Schu; 5 – *F. tularensis* A-678; 6, 7 – molecular weight marker (Thermo #26619); 8 – *F. novicida* Utah112

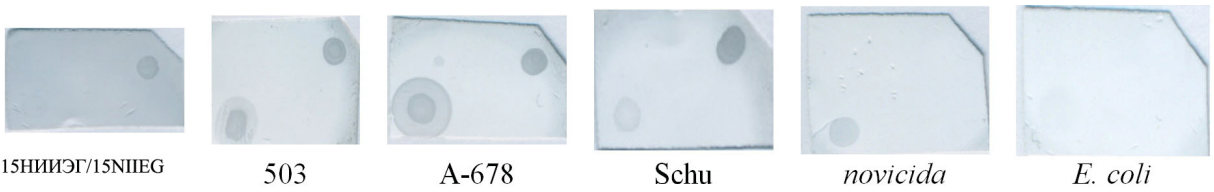

Рис. 3. Результаты дот-блота с сыворотками крыс после вакцинации (1×10^8м.к./крысу) штаммом 15 НИИЭГ или заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* различных подвидов (1×10^5м.к./крысу). В качестве отрицательного контроля использована сыворотка крысы, зараженной (1×10^8м.к./крысу) *E. coli*. В левом нижнем углу нанесен препарат ЛПС *F. novicida* Utah112, в правом верхнем – препарат ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Fig. 3. Results of dot blot with sera of rats after vaccination (dose 1×10^8 CFU/rat) with strain 15 NIIEG or infection with different subtypes by the virulent strains of *F. tularensis* (dose 1×10^5 CFU/rat). Serum of the rat infected of *E. coli* (dose 1×10^8 CFU/rat) was used as a negative control. LPS *F. novicida* Utah112 is applied in the lower left corner, and LPS *F. tularensis* 15 NIIEG is applied in the upper right

Результаты дот-блотинга подтверждают результаты иммуноблотов (данные не приведены) и согласуются с результатами Павлович [7, 16], свидетельствуя о наличии специфических антител к ЛПС *F. tularensis* и к ЛПС *F. novicida* при заражении вирулентными штаммами, в то время как при вакцинном процессе антитела к ЛПС *F. novicida* не выявляются.

Как отмечено выше, в последние годы исследователи уделяют пристальное внимание капсуле туляремийного микроба [3, 4, 17]. В самых ранних работах по туляремии описан феномен диссоциации культуры вакцинного штамма 15 НИИЭГ на голубые и серые колонии, который отражает существование у туляремийного микроба капсульных и бескапсульных форм [18, 19]. До настоящего времени структура капсулы полностью не изучена и поэтому по-прежнему привлекает внимание исследователей [20, 21]. Известно, что наличие капсулы и ее толщина влияют на вирулентность штаммов. Гены, ответственные за формирование капсулы, обнаружены у всех подвидов *F. tularensis*, в том числе и *F. novicida* [4, 22].

Исходя из предположения, что при выделении ЛПС по методу Westphal в водном растворе совместно с молекулами ЛПС попутно происходит и выделение капсульных углеводов, мы решили определить массовое соотношение гидрофобной (липид А) и гидрофильной (углеводной) части в каждом полученном образце. Для этого препаративные количества ЛПС, выделенные из штаммов различных подвидов, были подвергнуты мягкому кислотному гидролизу и определены массы углеводной части и липида А, а также их соотношение. Результаты приведены в таблице.

Результаты мягкого кислотного гидролиза липополисахаридов клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов*

Results of mild acid hydrolysis of the lipopolysaccharides of the cell wall of *F. tularensis* bacterial cells of various subspecies*

Штаммы *F. tularensis,* (метод выделения по Westphal) / Strains of *F. tularensis*, (isolation of LPS according to the Westphal's method)	Подвид / Subspecies	Масса проб для кислотного гидролиза, мг / Weight of samples for acid hydrolysis, mg	Масса углеводной части ЛПС, мг / Weight of carbohydrate moiety of LPS, mg	Масса липида А, мг / Lipid A mass, mg	Время появления осадка, мин / Time appearance of the sediment, min	Отношение углеводной части к липиду А / The ratio of carbohydrate part lipid A
15 НИИЭГ	*holarctica*	70	0,0385	0,0333	30	1,2
503	*holarctica*	70	0,0504	0,0190	40	2,7
А-678	*mediasiatica*	70	0,0432	0,0258	60	1,7
Schu	*tularensis*	70	0,0506	0,0169	105	3,0
Utah112	*novicida*	25	0,0159	0,0090	105	1,8

Примечание. *Приведены данные одного из трех независимых экспериментов.
Note. *The data of one of three independent experiments are given.

Интересно отметить, что для наиболее вирулентного из выбранных штамма Schu подвида *tularensis* соотношение массы углеводной части и массы липида А было равно 3, т. е. на одну гидрофильную часть, основой которой является О-антиген, приходится в 3 раза меньше массы липида А. Для штамма 503 голарктического подвида это соотношение составляет 2,7; для штамма 678 среднеазиатского подвида и для штамма Utah112 *F. novicida* соотношение гидрофильной и гидрофобной частей составляет, соответственно, 1,7 и 1,8, а наименьшим, равным 1,2, это соотношение оказалось у вакцинного штамма 15 НИИЭГ.

Учитывая, что О-антиген представляет собой повторяющийся тетрасахарид известной химической структуры, можно предположить, что в вирулентных штаммах 503, 678 и Schu и в штамме Utah112 (subsp. *novicida*) количество повторов структурной единицы О-антигена больше, чем в О-антигене вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Возможно, такое превалирование гидрофильной части в О-антигене у вирулентных штаммов обусловливает и наибольшую толщину капсульного вещества при условии приблизительно равных размеров бактериальной клетки у разных подвидов, а для вакцинного штамма 15 НИИЭГ характерно малое количество повторов структурной единицы О-антигена и, как следствие, уменьшение толщины капсулы.

Особый интерес представляет результат мягкого кислотного гидролиза штамма *F. novicida* Utah112 – для него соотношение гидрофильной и гидрофобной частей составляет 1,8, что ставит

его в один ряд с природным штаммом 678 среднеазиатского подвида. Мы не нашли в литературе данных о наличии у *F. novicida* капсулы, хотя, как упоминалось ранее, гены, ответственные за синтез капсулы, аналогичные генам штамма Schu и LVS, у него присутствуют [4].

Чтобы проверить гипотезу о наличии капсулы у штамма *F. novicida* Utah112, для анализа внешних морфологических структур микробных клеток *F. tularensis* разных подвидов была использована электронная микроскопия – метод негативного контрастирования, позволяющий проводить морфологический и морфометрический скрининг микробной популяции.

Полученные электронные микрофотографии представлены на рис. 4.

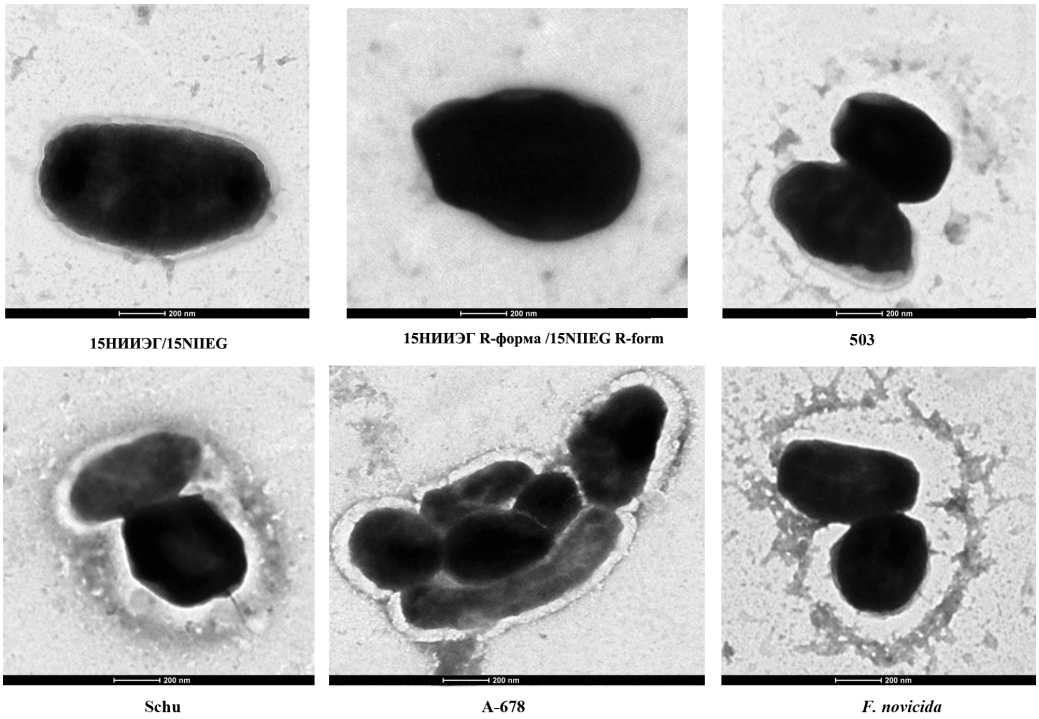

Рис. 4. Электронно-микроскопическое изображение негативно-контрастированных бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов. Увеличение: 15 НИИЭГ и 15 НИИЭГ R-форма − ×24 000; 503, Schu, A-678 и *F. novicida* − ×18 000

Fig. 4. Electron-microscopic image of negatively-contrasted bacterial cells of *F. tularensis* of various subspecies. 15 NIIEG and 15 NIIEG R-form magnification is ×24 000 ; 503, Schu, A-678 and *F. novicida* magnification is ×18 000

Анализ электронно-микроскопических изображений бактериальных клеток штаммов разных подвидов показал, что клетки всех изучаемые штаммов, кроме R-формы вакцинного штамма, окружены капсульным веществом. Капсульное вещество у штамма 15 НИИЭГ при контрастировании изображения видно очень слабо, среди всех изученных штаммов толщина капсулы наименьшая и составляет 50÷100 нм. У вирулентных штаммов 503 subsp. *holarctica,* A-678 subsp. *mediasiatica* и наиболее вирулентного штамма Schu subsp. *tularensis* толщина капсулы составила 150÷250 нм. Следует отметить, что на подготовленных для электронной микроскопии препаратах бактериальных клеток штамма Schu наблюдали большой процент клеток, у которых капсула отсутствовала, и это позволило нам предположить, что для данного штамма характерно быстрое слущивание капсулы, а наличие капсулы на вирулентных штаммах более выражено на молодых делящихся клетках. Интересно, что для клеток штамма *F. novicida* Utah112 толщина капсулы не отличалась от толщины капсулы вирулентных штаммов и составляла также, по нашим данным, 150÷250 нм (см. рис. 4). Наши результаты по анализу толщины капсулы, определенной методом электронной микроскопии, и анализу соотношений гидрофильной и гидрофобной частей молекул, выделенных ЛПС из штаммов различных подвидов, позволили выявить корреляцию между этими двумя показателями (см. таблицу) и сделать предположение, что толщина капсулы туляремийного микроба может быть обусловлена большей длиной О-полисахаридных цепей.

В исследованиях, касающихся изучения липополисахарида туляремийного микроба, являющегося основным антигенным компонентом его клеточной стенки, мы опирались на результаты зарубежных исследователей о его структуре [4–6, 14]. Особенностью туляремийного ЛПС являются биологическая инертность очищенных препаратов, преобладание свободного липида А, наличие в нем только четырех длинных жирнокислотных остатков, а в коре только одного Kdo [23, 24]. Кроме того, в последние годы исследователи большое внимание уделяют капсуле, которая, как считается, представляет собой полисахарид, идентичный О-антигену [3, 4].

По данным Gunn (2007) [14], химическая структура О-антигена липополисахарида голарктического, среднеазиатского и неарктического подвидов представляет собой повторяющийся тетрасахарид, который соединен с β-D-QuiNAc и β-DQui4NFm. Структура О-антигена *F. novicida* также представляет собой повторяющийся тетрасахарид, однако имеет некоторые отличия в составе сахаров: вместо β-DQui4NFm имеется еще один остаток α-D-GalNAcAN, а вместо β-D-QuiNAc – остаток β-DQui2NAc4NAc [14].

Предполагая, что О-антиген является основной составляющей капсульного вещества, а именно его толщиной определяется вирулентность штаммов [3, 4], мы выделили ЛПС из штаммов бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis, holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) методом Westphal с модификациями и провели сравнительный анализ полученных препаратов.

При соотнесении результатов определения толщины капсулы методом электронной микроскопии и данных о соотношении гидрофильной и гидрофобной частей выделенных препаратов ЛПС из штаммов различных подвидов выявлена взаимосвязь этих двух показателей и сделано предположение о том, что толщина капсулы туляремийного микроба коррелирует с величиной соотношения гидрофильной и гидрофобной частей ЛПС – чем оно выше, тем толще наблюдаемое капсульное вещество, следовательно, наибольшая толщина капсулы у вирулентного штамма может быть обусловлена наибольшей длиной О-полисахаридных цепей в молекуле ЛПС.

Наши результаты исследований по штамму Utah112 *F. novicida* свидетельствуют, что этот штамм обладает капсулой, которая выявляется методом электронной микроскопии, а соотношение гидрофильной и гидрофобной частей приближено к значениям, характерным для вирулентных штаммов.

Вероятно, большое число повторяющихся звеньев, составляющих структурную единицу О-антигена ЛПС вирулентных штаммов, обусловливает большую толщину капсулы по отношению к вакцинному штамму 15 НИИЭГ и, как следствие, появление большего разнообразия эпитопов для связывания антител, которые могут реагировать не только с ЛПС из штаммов подвидов *holarctica*, *mediasiatica* и *tularensis,* но и с несколько отличающимся по структуре ЛПС *F. novicida*. Именно намного меньшая, по сравнению с вирулентными штаммами, толщина капсулы вакцинного штамма 15 НИИЭГ может лежать в основе того, что после вакцинации в сыворотке вакцинированных людей и животных антитела, которые связываются с ЛПС *F. novicida,* не выявляются.

Благодарности

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Список литературы

1. *Cowley S. C., Elkins K. L.* Immunity to *Francisella* // Frontiers in Microbiology. 2011. Vol. 2. P. 1–20.
2. *Fulop M., Manchee R., Titball R.* Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia // Vaccine. 1995. Vol. 13. P. 1220–1225.
3. *Apicella M. A., Post D. M., Fowler A. C., Jones B. D., Rasmussen J. A., Hunt J. R., Gibson B. W.* Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis* // PLoS ONE. 2010. Vol. 5(7). e11060.
4. *Rowe H. M., Huntley J. F.* From the outside-in : The *Francisella tularensis* envelope and virulence // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2015. Vol. 5. P. 94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094
5. *Vinogradov E. V., Perry M. B., Conlan J. W.* Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269, № 24. P. 6112–6118. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03321.x
6. *Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Tochtamysheva N. V., Averin S. F., Goncharova O. V., Khlebnikov V. S.* Structure of the O-antigen of *Francisella tularensis* strain 15 // Carbohydr. Res. 1991. Vol. 214. P. 289–297. DOI: 10.1016/0008-6215(91)80036-M
7. *Аронова Н. В., Павлович Н. В.* Фазовые вариации липополисахарида возбудителя туляремии при инфекции и иммунизации человека // ЖМЭИ. 2005. Вып. 4. С. 8–12.
8. *Westphal O., Jann K.* Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure // Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965. Vol. 5. P. 83–91.
9. *Galanos C., Luderitz O., Westphal O.* A new method for the extraction of R lipopolysaccharides // Eur. J. Biochem. 1969. Vol. 9. P. 245–249.
10. *Morrison L. J., Parker W. R., Holden D. D., Henderson J. C., Boll J. M., Trent M. S., Brodbelt J. S.* UVliPiD : A UVPD-based hierarchical approach for *de novo* characterization of lipid A structures // Analyt. Chem. 2016. Vol. 88, № 3. P. 1812–1820. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04098

11. *Raetz C. R., Guan Z., Ingram B. O., Six D. A., Song F., Wang X., Zhao J.* Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story // J. Lipid Res. 2009. Vol. 50. P. 103–108. DOI: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
12. *Raetz C. R., Reynolds C. M., Trent M. S., Bishop R. E.* Lipid A modification systems in gram-negative bacteria // Ann. Rev. Biochem. 2007. Vol. 76. P. 295–329.
13. *Raetz C. R., Whitfield C.* Lipopolysaccharide endotoxins // Ann. Rev. Biochem. 2002. Vol. 71. P. 635–700.
14. *Gunn J. S., Ernst R. K.* The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide // Annals of the New York Academy of Sciences. 2007. Vol. 1105. P. 202–218. DOI: 10.1196/annals.1409.006
15. *Tsai C. M., Frash C. E.* A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 115–119.
16. *Аронова Н. В., Павлович Н. В.* Использование препаратов липополисахарида *Francisella tularensis* в точечном твердофазном иммуноферментном анализе // ЖМЭИ. 2000. Вып. 5. С. 75–78.
17. *Barker J. H., Kaufman J. W., Apicella M. A., Weiss J. P.* Evidence suggesting that *Francisella tularensis* O-antigen capsule contains a lipid A-like molecule that is structurally distinct from the more abundant free lipid A // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, № 6. e0157842. DOI: 10.1371/journal.pone.0157842
18. *Олсуфьев Н. Г.* Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М. : Медицина, 1975. 192 с.
19. *Олсуфьев Н. Г., Руднев Г. П.* Туляремия. М. : Медгиз, 1960. 459 с.
20. *Soni S., Ernst R. K., Muszyński A., Mohapatra N. P., Perry M. B., Vinogradov E. V., Carlson R. W., Gunn J. S. Francisella tularensis* blue-gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy // Frontiers in Microbiology. 2010. Vol. 1. P. 129. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00129
21. *Sorokin V. M., Pavlovich N. V., Prozorova L. A. Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996. Vol. 13. P. 249–252.
22. *Kingry L. C., Petersen M.* Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida* // J. Front. Cell Infect. Microbiol. 2014. Vol. 4. P. 35. DOI: 4:35. 10.3389/fcimb.2014.00035
23. *Okan N. A., Kasper D. L.* The atypical lipopolysaccharide of *Francisella* // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 378. P. 79–83. DOI:10.1016/j.carres.2013.06.01
24. *Wang X., Ribeiro A. A., Guan Z., McGrath S. C., Cotter R. J., Raetz C. R.* Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida* // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 48. P. 14427–14440. DOI: 10.1021/bi061767s

Образец для цитирования:

Горбатов А. А., Титарева Г. М., Кравченко Т. Б., Шайхутдинова Р. З., Герасимов В. Н., Мокриевич А. Н., Фирстова В. В. Влияние химической структуры О-антигена разных подвидов *Francisella tularensis* на иммунологические реакции // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 2. С. 207–215. DOI: https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-207-215

Effect of the O-Antigen Chemical Structure in Different Subspecies of *Francisella Tularensis* on Immunological Reactions

A. A. Gorbatov, G. M. Titareva, T. B. Kravchenko, R. Z. Shaykhutdinova, V. N. Gerasimov, A. N. Mokrievich, V. V. Firstova

Alexey A. Gorbatov, https://orcid.org/0000-0002-0799-893X, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, gorbatov1986@mail.ru

Galina M. Titareva, https://orcid.org/0000-0001-9478-5563, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, titarevag@mail.ru

Tatyana B. Kravchenko, https://orcid.org/0000-0002-4681-1787, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, kravchenko@obolensk.org

Rima Z. Shaykhutinova, https://orcid.org/0000-0002-6985-6822, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, shaikhutdinova@yandex.ru

Vladimir N. Gerasimov, https://orcid.org/0000-0002-0473-7785, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, ilcvngerasimov@obolensk.org

Alexander N. Mokrievich, https://orcid.org/0000-0003-3675-8780, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, mokrievich@obolensk.org

Victoria V. Firstova, https://orcid.org/0000-0002-9898-9894, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region 142279, Russia, firstova@obolensk.org

The greatest diagnostic significance for tularemia is played by antibodies against lipopolysaccharide (LPS). Previously, it has been shown that specific antibodies that appear in the blood serum of laboratory animals infected with virulent strains and people who have recovered from tularemia can bind both to LPS *Francisella tularensis* and to LPS *Francisella novicida*, while after the vaccination specific antibodies to LPS *F. novicida* are absent. The aim of this work was to investigate the effect of the structure of the O-antigen of lipopolysaccharide *F. tularensis* of various subspecies on immunological reactions with specific antibodies. The method to isolate LPS from the various *F. tularensis* strains according to Westphal with modifications was used, and mild acid hydrolysis, and a method of negative contrast in carrying out electron microscopy were used. The ratio of hydrophilic and hydrophobic components of LPS molecules isolated from strains of various subspecies is determined. Correlation of the size of a capsular substance, determined by electron microscopy, with the ratio of hydrophilic and hydrophobic parts in LPS preparations obtained from the same strains was found. It was shown that in virulent strains of *F. tularensis* the capsule thickness and the ratio of the hydrophilic and hydrophobic parts were higher than those of the

vaccine strain 15 NIIEG. Data indicating the presence of a capsule in *F. novicida* strain were obtained. A hypothesis is proposed that explains the cross-reacting of the sera of humans and animals infected with virulent strains, and with *F. tularensis* LPS, and with *F. novicida* LPS.
Keywords: *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, lipopolysaccharide, O-antigen, capsule, specific antibodies.

***Acknowledgements**: This work was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.*

Reference

1. Cowley S. C., Elkins K. L. Immunity to *Francisella*. *Frontiers in Microbiology*, 2011, vol. 2, pp. 1–20.
2. Fulop M., Manchee R., Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisellatularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 1995, vol. 13, pp. 1220–1225.
3. Apicella M. A., Post D. M., Fowler A. C., Jones B. D., Rasmussen J. A., Hunt J. R., Gibson B. W. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisellatularensis*. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5 (7), e11060.
4. Rowe H. M., Huntley J. F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015,vol. 5, pp. 94. DOI:10.3389/fcimb.2015.00094
5. Vinogradov E. V., Perry M. B., Conlan J. W. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem*., 2002, vol. 269, no. 24, pp. 6112–6118. DOI:10.1046/j.1432-1033.2002.03321.x
6. Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Knirel Y. A. Kochetkov N. K., Tochtamysheva N. V., Averin S. F., Goncharova O. V., Khlebnikov V. S. Structure of the O-antigen of *Francisella tularensis* strain 15. *Carbohydr. Res*., 1991, vol. 214, pp. 289–297. DOI:10.1016/0008-6215(91)80036-M
7. Aronova N. V., Pavlovich N. V. Phase variations of lipopolysaccharide tularemia pathogen during human infection and immunization. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, iss. 4, pp. 8–12 (in Russian).
8. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, vol. 5, pp. 83–91.
9. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem*., 1969, vol. 9, pp. 245–249.
10. Morrison L. J., Parker W. R., Holden D. D., Henderson J. C., Boll J. M., Trent M. S., Brodbelt J. S. UVliPiD: A UVPD-based hierarchical approach for *de novo* characterization of lipid a structures. *Analyt. Chem*., 2016, vol. 88, no. 3, pp.1812–1820. DOI:10.1021/acs.analchem.5b04098
11. Raetz C. R., Guan Z., Ingram B. O., Six D. A., Song F., Wang X., Zha J. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid a story. *J. Lipid Res*., 2009, vol. 50, pp. 103–108. DOI: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
12. Raetz C. R., Reynolds C. M., Trent M. S., Bishop R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 2007, vol. 76, pp.295–329.
13. Raetz C. R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Ann. Rev. Biochem*., 2002, vol. 71, pp. 635–700.
14. Gunn J. S., Ernst R. K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharid. *Ann. of the New York Academy of Sciences*, 2007, vol. 1105, pp. 202–218. DOI:10.1196/annals.1409.006
15. Tsai C. M., Frash C. E. A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*., 1982, vol. 119, pp. 115–119.
16. Aronova N. V., Pavlovich N. V. Use of lipopolysaccharide preparations *Francisella tularensis* in point solid-state enzyme immunoassay. *Journal of Microbiolody, Epidemiology and Immunobiology*, 2000, vol. 5, pp. 75–78 (in Russian).
17. Barker J. H., Kaufman J. W., Apicella M. A., Weiss J. P. Evidence suggestingthat *Francisella tularensis* O-antigen capsule contains a lipid A-like molecule that is structurally distinct from the more abundant free lipid A . *PLoS ONE*, 2016, vol.11, iss. 6, e0157842. DOI: 10.1371/journal.pone.0157842
18. Olsuf'ev N. G. *Taksonomiya, mikrobiologiya I laboratornaya diagnostika vozbuditelya tulyaremii* [Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of the causative agent of tularemia]. Moscow, Meditsina Publ., 1975. 192 p. (in Russian).
19. Olsuf`ev N. G., Rudnev G. P. *Tulyaremiya* [Tularemia]. Moscow, Medgiz Publ.,1960. 459 p. (in Russian).
20. Soni S., Ernst R. K., Muszyński A., Mohapatra N. P., Perry M. B., Vinogradov E. V., Carlson R. W., Gunn J. S. *Francisella tularensis* blue-gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophagesurvival and vaccine efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 2010, vol. 1, pp. 129. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00129
21. Sorokin V. M., Pavlovich N. V., Prozorova L. A. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum . *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., 1996, vol. 13, pp. 249–252.
22. Kingry L. C., Petersen M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *J. Front Cell Infect. Microbiol*., 2014, vol. 4, pp. 35. DOI: 4:35.10.3389/fcimb.2014.00035
23. Okan N. A., Kasper D. L. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. *Carbohydr. Res*., 2013, vol. 378, pp. 79–83. DOI: 10.1016/j.carres.2013.06.01
24. Wang X., Ribeiro A. A., Guan Z., McGrath S. C., Cotter R. J., Raetz C. R. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 48, pp. 14427–14440. DOI: 10.1021/bi061767s

Cite this article as:

Gorbatov A. A., Titareva G. M., Kravchenko T. B., Shaykhutdinova R. Z., Gerasimov V. N., Mokrievich A. N., Firstova V. V. Effect of the O-Antigen Chemical Structure in Different Subspecies of Francisella Tularensis on Immunological Reactions. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 2, pp. 207–215 (in Russian). DOI: https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-207-215